Aula 2

MICROSCÓPIO ÓTICO:
RESOLUÇÃO E MODALIDADES DE OBSERVAÇÃO

META

Conceituar ampliação e resolução.
Apresentar algumas técnicas de observação em microscopia ótica.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
Entender a importância da resolução na qualidade da imagem produzida pelo microscópio ótico;
compreender as diferentes modalidades de observação em microscopia ótica.

PRÉ-REQUISITO

O aluno deverá entender o mecanismo de obtenção de imagens através do microscópio ótico.
Saber reconhecer as partes do microscópio ótico e seu funcionamento.

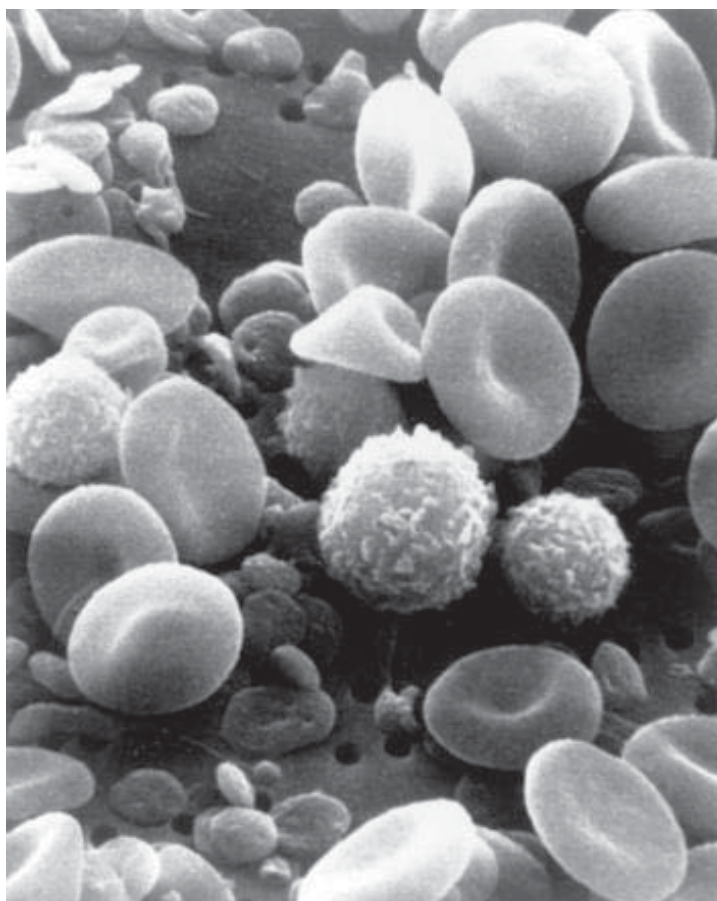
Fabiana Silva Vieira

INTRODUÇÃO

Como verificamos na aula passada, o aumento total do objeto observado, obtido pelo microscópio ótico (MO),

é calculado através da multiplicação dos valores do aumento da ocular pelo da objetiva utilizada. Então, se a ocular fornecer um aumento de 10x e a objetiva de 40x, o aumento final será de 400x.

O tamanho dos objetos observados em microscopia é limitado pelo **comprimento de onda** da radiação utilizada. Para o MO, o comprimento de onda da luz varia entre 0,4 a 0,7 mm, sendo o valor fixado em aproximadamente 0,5 mm. No entanto, uma das características mais importantes de um microscópio não é a sua capacidade de ampliação, mas o seu poder de resolução, isto é, a riqueza de detalhamento que o aparelho permite mostrar em relação ao espécime observado. A ampliação somente promove o aumento da imagem e não o nível dos detalhes que podem ser observados. E é sobre resolução que iremos aprofundar os nossos conhecimentos nesta aula. Mas antes disso, vamos definir as unidades de medidas utilizadas em microscopia.

Ver glossário no final da Aula

Células observadas ao microscópio ótico (Fonte: http://cbme.usp.br).

MEDIDAS

As dimensões das estruturas observadas podem ser macroscópicas, visíveis a olho nu, e microscópicas, difíceis de serem vistas pelo olho humano. As medidas microscópicas empregadas são o micrômetro (μm), para a microscopia ótica, e o nanômetro (nm) e o Angstrom (Å), para a microscopia eletrônica. A sua relação com a unidade fundamental do sistema métrico, o milímetro (mm), e com o metro (m), é a seguinte:

1 μm = 10^{-3} mm = 10^{-6} m
1 nm = 10^{-6} mm = 10^{-9} m
1 Å = 10^{-7} mm = 10^{-10} m

RESOLUÇÃO

Quando falamos de resolução, estamo-nos referindo à qualidade da imagem obtida no microscópio, isto é, ao detalhamento. O limite de resolução determina a ampliação máxima útil do microscópio e corresponde à menor distância entre dois pontos que ainda podem ser distinguidos separadamente.

Para entender melhor o que abordamos no parágrafo anterior, vamos ao seguinte exemplo. O limite de resolução do olho humano, ou seja, a menor distância que conseguimos distinguir entre dois pontos adjacentes é de 0,2mm. Portanto, valores entre dois pontos menores que este, como 0,1mm, são imperceptíveis ao nosso olhar e, desta forma, ao invés de serem distinguidos como dois pontos, aparecem como uma única imagem. Conseguiu entender? Então compreendeu o que é limite de resolução!

Esse limite é determinado pelo comprimento de onda de luz visível e da abertura numérica (AN) da lente objetiva, que estabelecem a máxima potência luminosa captada por esta lente. O limite da objetiva é dado pela seguinte fórmula:

$LR = k\lambda/AN$ em que,
LR é o limite de resolução;
k é uma constante equivalente a 0,61;
ë (lâmbida) é o comprimento de onda da luz utilizada;
AN é o número de abertura da lente objetiva.

A AN pode ser definida como o tamanho do cone de luz que entra nas lentes do microscópio após passar pela amostra. Este valor varia de acordo com o aumento e para cada objetiva (Figura 1).

A abertura numérica é dada pela fórmula: $AN = \eta \text{ sen } \alpha$, cujos elementos têm o seguinte significado:
η é o índice de refração do meio;

α (alfa) é o semi-ângulo da AN, ou seja, corresponde à metade do comprimento do cone de luz recebido pela lente. O valor máximo é de 90 graus e seu seno é igual a 1.

O maior valor calculado para AN é de 1,4 e só pode ser atingido com a objetiva de imersão. O limite de resolução para o MO pode ser calculado como:

LR = 0,61 x 0,5 / 1,4 LR = 0,22 μm

Então, lembre-se de que ao utilizarmos um microscópio, devemos verificar o número de abertura de suas objetivas, pois o melhor microscópio é aquele que apresenta o maior número da AN, ou seja, quanto maior for o valor da abertura da lente objetiva usada, maior será o seu poder de resolução.

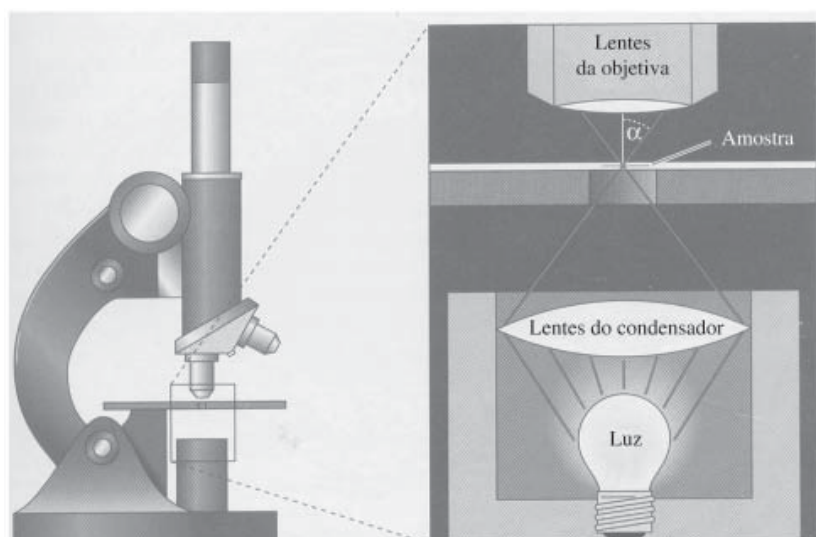



Figura 1 - Esquema representativo da abertura numérica (Fonte: Cooper, 2005).

ILUMINAÇÃO DE KÖHLER

A correta iluminação em microscopia é tão importante quanto a utilização de boas lentes. Em 1893, com o trabalho de August Köhler, começou-se a discutir melhorias no sistema de iluminação dos microscópios. A técnica Köhler tem sido amplamente divulgada desde meados do século XX e é tida como fundamental para a obtenção de uma iluminação de excelente qualidade em termos de intensidade de luz e distribuição homogênea no campo observado. Diante destes aspectos, como devemos proceder para fazer a observação do espécime escolhido? É só seguirmos as etapas enumeradas a seguir.

1. Fechar o diafragma de campo e do condensador cerca de 2/3. Em seguida, aparecerá uma imagem facetada.

2. Centralizar essa imagem.
3. Abrir o diafragma de abertura até iluminar uniformemente o campo.

MODALIDADES DE OBSERVAÇÃO EM MICROSCÓPIOS ÓTICOS

Agora, vamos começar a tratar sobre as diversas técnicas de microscopia ótica. É importante conhecê-las para sabermos o tipo de microscópio mais adequado numa determinada análise. Detalharemos nove técnicas a seguir.

1. Campo claro
2. Campo escuro
3. Contraste de fase
4. Contraste interferencial diferencial
5. Polarização
6. Fluorescência
7. Confocal a laser
8. Microscópio invertido
9. Microscópio estereoscópico

CAMPO CLARO

Todos os microscópios funcionam com campo claro. A utilização desse microscópio é mais adequada na observação de estruturas que têm coloração própria. Mas para uma melhor visualização de estruturas muito claras, é necessário o uso de **corantes** (Figura 2).

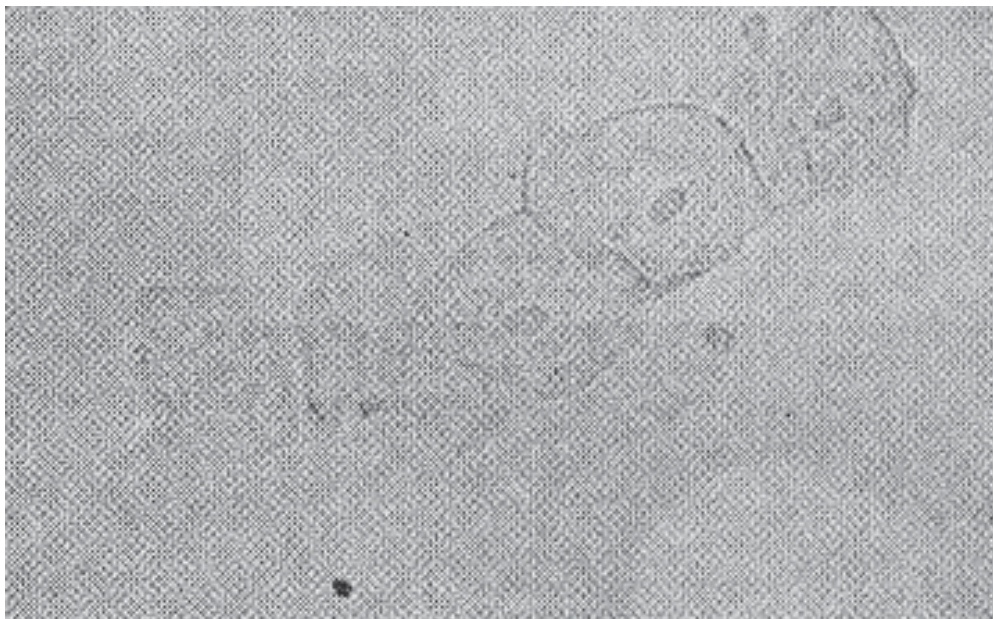



Figura 2 - Micrografias de células humanas obtidas a partir de microscopia de campo claro. (Fonte: Cooper, 2005).

CAMPO ESCURO

Neste caso, a imagem é resultante dos feixes de luz que são desviados pelo material observado. Isto ocorre porque se coloca um disco opaco abaixo da lente condensadora que ilumina o objeto obliquamente. A luz dispersada chega à objetiva e o objeto aparece iluminado e brilhante sobre um fundo escuro, permitindo, assim, que somente suas bordas sejam observadas (Figura 3). É ideal para a observação de estruturas transparentes como bactérias, plâncton, pólen e cristais que apresentam pouco contraste para serem vistos em microscópio claro.

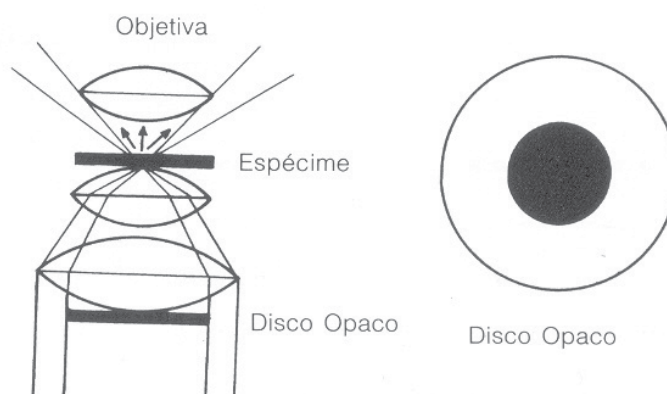



Figura 3 - Microscopia de campo escuro (Fonte: Leal, 2000).

CONTRASTE DE FASE

A maior parte dos detalhes de células vivas não é detectada pelos microscópios anteriormente citados, pois suas estruturas são transparentes, não apresentando contraste suficiente. O microscópio de contraste de fase tem um sistema ótico especial que torna possível a distinção de materiais biológicos que se diferem ligeiramente quanto aos seus índices de refração.

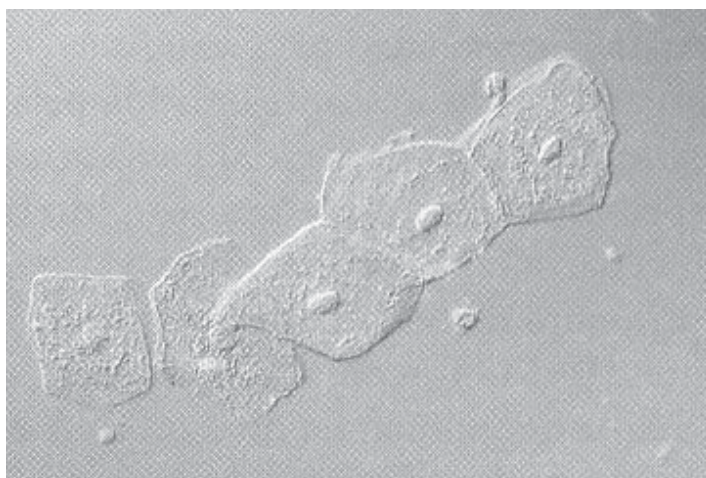



Figura 4 - Micrografias de células humanas obtidas a partir de microscopia de contraste interferencial diferencial (Fonte: Cooper, 2005).

O princípio de seu funcionamento baseia-se na conversão das variações de densidade ou espessura do material observado em diferenças de contraste. As estruturas levadas ao MO causam retardos na luz que as atravessa, correspondente a ¼ do comprimento de onda da luz não desviada, resultando, assim, em perda de contraste. Para corrigir esta defasagem, o físico e matemático holandês **Frits Zernike** desenvolveu um anel que pode acelerar ou retardar em ¼ do comprimento de onda, gerando diferenças de intensidade luminosa que melhoram consideravelmente o contraste (Figura 4).

Indicado no estudo de material biológico não corado, este tipo de microscópio pode ser usado de modo que o espécime analisado apareça em escuro e o fundo em claro, resultando no que chamamos de contraste de fase positiva. Além desta opção, é possível que os detalhes estejam mais claros e o fundo escuro, caracterizando o contraste de fase negativa.

CONTRASTE INTERFERENCIAL DIFERENCIAL

Assim como na microscopia de contraste de fase, o microscópio de contraste interferencial diferencial tem a imagem produzida a partir de diferenças de densidade do objeto observado. Ele é útil para o trabalho com materiais de até mais de 100 mm de espessura, que são inadequados para o contraste de fase, ou quando se está visualizando pequenos detalhes sem corar, cujo halo de contraste de fase esteja causando distorções na imagem. Além de ser a mais popular, a microscopia de contraste interferencial diferencial de Nomarski ainda tem uma vantagem sobre a técnica anteriormente citada: é a de maior resolução e sensação de relevo (Figura 5).

POLARIZAÇÃO

No microscópio de polarização há dois prismas: o polarizador e o analisador, que permitem estudar certos aspectos da organização molecular dos constituintes celulares anisotrópicos, isto é, que tenham dois índices de refração, como músculos, ossos, celulose, fibras, cabelos, cristais, entre outros. Ao atravessar a célula destas estruturas denominadas birrefringentes ou anisotrópicas, o feixe polarizado se divide em dois. Essas estruturas produzirão um tipo de vibração luminosa que ficará brilhante. Mas é importante você observar que somente as estruturas birrefringentes aparecerão brilhantes, ficando o restante do material escuro. As estruturas celulares que não apresentam tal organização não modificam o plano de polarização da luz e são chamadas isotrópicas.

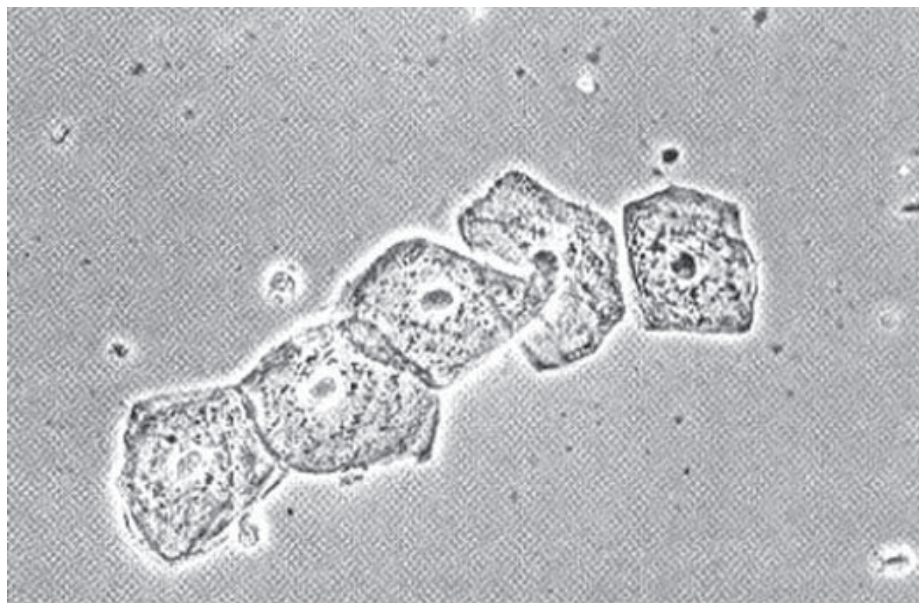



Figura 5. Micrografias de células humanas obtidas a partir de microscopia de contraste interferencial diferencial (Fonte: Cooper, 2005).

FLUORESCÊNCIA

Fluorescência é a propriedade de algumas substâncias emitirem radiação de maior comprimento de onda após serem excitadas com radiação de baixo comprimento de onda. Certas substâncias absorvem a radiação ultravioleta, emitindo depois radiação dentro do espectro da luz visível. Espécimes corados com corante fluorescente aparecem como objetos luminosos quando observados com luz ultravioleta.

Portanto, a fluorescência é o princípio de que um corpo absorve luz e, após um curto intervalo de tempo, emite essa luz. O emprego de compostos químicos chamados corantes fluorescentes é necessário para produzir a fluorescência do material em estudo. Essa técnica é normalmente empregada na análise de moléculas no interior celular.

Vamos entender melhor como a imagem é gerada. A amostra previamente marcada com o corante fluorescente é levada para observação. A luz fornecida pela lâmpada de tungstênio passa através de um primeiro filtro (filtro excitatório), em que o comprimento de onda da luz é selecionado para excitar o corante fluorescente. O corante absorve esse primeiro comprimento de luz (azul), mas a imagem será formada por um segundo comprimento de onda (verde) emitido pelo espécime (Figura 6). Esta técnica é utilizada para análises de proteínas e estruturas intracelulares.

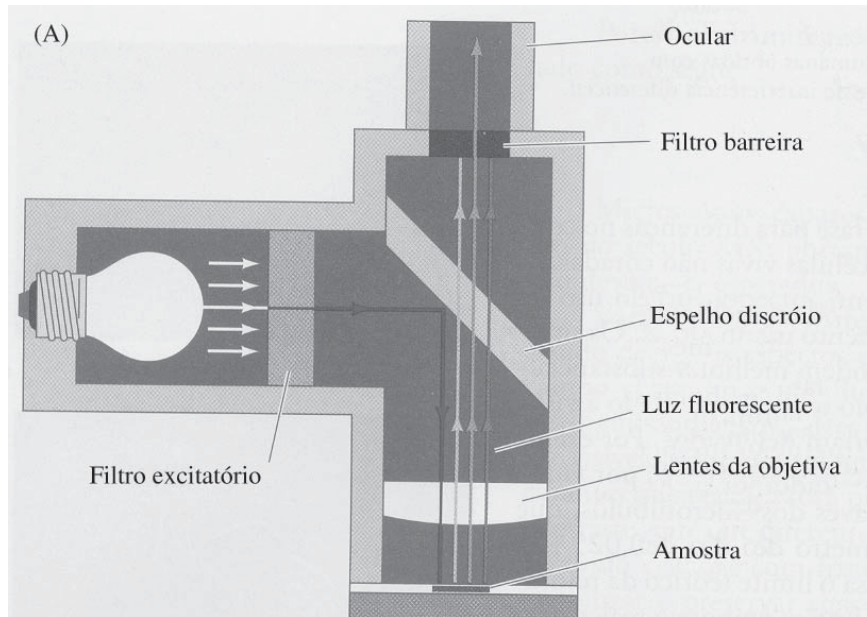



Figura 6 - Esquema mostrando o funcionamento do microscópio de fluorescência (Fonte: Leal, 2000).

CONFOCAL A LASER

O funcionamento deste tipo de microscópio é semelhante ao que acabamos de descrever na microscopia de fluorescência. Porém, em vez de uma fonte de luz para promover a excitação dos corantes fluorescentes, utilizamos uma fonte a laser. Trata-se de um MO que funciona em modo de varrimento. O feixe luminoso irradia apenas um ponto da preparação produzido pelo laser e, através de um conjunto de lentes, o microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada.

Mudando-se o ponto focal e mantida a profundidade, é possível iluminar todo o plano em estudo, varrendo a amostra ponto a ponto. A luz do laser passa por um pequeno orifício (pinhole) e ilumina um único ponto do espécime. A fluorescência emitida pelo material é coletada e conduzida para um detector que tem um segundo orifício pequeno. O que nos permite concluir que a imagem final obtida é aquela captada pelo segundo orifício. Deste modo, a obtenção de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra possibilita construir imagens tridimensionais. O confocal a laser ou LSM (laser sacanning microscope) fornece imagens tridimensionais e medidas da relação volume/organela em relação ao volume total da célula.

MICROSCÓPIO INVERTIDO

O nome deste microscópio se deve ao fato de todo o seu sistema de iluminação se encontrar invertido. É indicado para o estudo de células em tubos e garrafas fechados, pois evita problemas de contaminação.

MICROSCÓPIO ESTEREOSCÓPICO

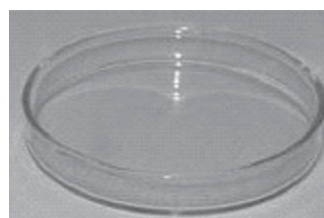
Conhecido como lupa, este tipo de microscópio dispõe de oculares para ampliação do material. É muito prático para fazer manipulação, pois a preparação é colocada diretamente sobre uma **placa de Petri**, não necessitando usar lâmina e lamínula (Figura 7).

(Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Placa_de_Petri)

Figura 7 - Microscópio estereoscópico ou lupa.

CONCLUSÃO

A o encerrarmos esta aula, concluímos que a capacidade de resolução de um microscópio é requisito fundamental para a qualidade do detalhamento da imagem do espécime em análise. Por isso, a escolha do microscópio ótico mais adequado ao trabalho a ser desenvolvido envolve a avaliação das características de cada uma de suas técnicas, pois cada uma delas oferece vantagens específicas na visualização de determinados elementos morfológicos.

RESUMO

Nesta aula, demos continuidade aos estudos sobre o microscópio ótico (MO), centrando-nos na importância da resolução para a qualidade da imagem produzida. Assim, verificamos que o poder de resolução depende do comprimento de onda da luz e da abertura numérica (NA) da lente objetiva utilizada, que proporcionará uma maior riqueza de detalhes do espécime analisado. Também estudamos as diversas técnicas de microscopia ótica e suas aplicações de acordo com o material em análise. A microscopia de campo claro é comum a todos os MO, enquanto a de campo escuro é um tipo de microscopia indicada para a observação de pequenos objetos como bactérias, plânctons, pólen e cristais. O microscópio de contraste de fase torna possível a distinção de materiais biológicos a partir de diferenças dos seus índices de refração. As ondas de luz que passam através de materiais com diferentes densidades o farão em diferentes velocidades. Desse modo, os feixes luminosos ao atravessarem, por exemplo, cloroplastos e núcleos, irão emergir em tempos e fases distintos. Essas diferenças conferem o contraste necessário para observação minuciosa do objeto. Esta técnica é ideal para se trabalhar com material vivo em que o uso do corante não é desejável. A microscopia de contraste interferencial diferencial de Nomarski permite uma ótima visualização para matérias com espessura de até 100 mm. A técnica de polarização permite que o feixe de luz, ao passar através de estruturas birrefringentes, como colágeno, cromossomos, osso, cabelo, fibras musculares e de tecido conjuntivo, seja dividido, de modo que dois raios luminosos sejam obtidos a partir de um único feixe. A técnica de fluorescência é utilizada para análises de proteínas e estruturas intracelulares e a confocal a laser ou LSM (laser scanning microscope) fornece imagens tridimensionais e medidas da relação volume/organela com o volume total da célula. O MO invertido é empregado para visualização de materiais muito espessos como garrafas ou tubos de ensaio com culturas de célula. No microscópio estereoscópico ou lupa não se prepara o material entre lâmina e lamínula, permitindo o manuseio do espécime durante a observação.

ATIVIDADES

1. O microscópio "A" tem objetiva de 10x de AN 0,15 com ocular 20x, com aumento de 200x. O microscópio "B" tem objetiva de 40x de AN 0,65 com ocular 5x e aumento de 200x. Qual desses terá a melhor resolução?
2. Qual microscópio você escolheria para observação de garrafas de cultura de células?
3. Quais os critérios para a escolha de um bom microscópio?

COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Lembre-se de que o poder de resolução está relacionado à abertura numérica.
2. É importante entender as técnicas de microscopia ótica para poder, então, escolher o mais adequado para sua observação.
3. A escolha de um bom MO é muito particular, pois dependerá do espécime que se deseja visualizar. Assim, para esta questão, cabe uma resposta mais geral, não se esquecendo do conceito de poder de resolução.

REFERÊNCIAS

BENCHIMOL, Marlene et al. **Métodos de estudo de célula.** Rio de Janeiro: Fenorte/UENF, 1996.

COOPER, Geoffrey M. **A célula**: uma abordagem molecular. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005.

DE ROBERTIS, Eduardo; HIB, José; PONZIO, Roberto. **Biologia celular e molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. **Biologia celular e molecular.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

LEAL, Luiz Henrique Monteiro. **Fundamentos de microscopia.** Rio de Janeiro: UERJ, 2000.

MELO, Rosana C. N. **Células e microscopia**: princípios básicos e práticas. Minas Gerais: EDUFJF, 2003.

VALLE, Francisco das Chagas. **Práticas de citologia e genética.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

GLÓSSARIO

Comprimento de onda: Distância entre dois pontos numa onda.

Corantes: A maior parte das estruturas levadas para MO são incolores, o que dificulta sua observação. Por esse motivo, foram introduzidos os corantes que servem para corar as estruturas biológicas de tal modo que seus componentes se tornem visíveis.

Frits Zernike: Físico e matemático holandês, nascido em Amsterdã (1888 - 1966). Prêmio Nobel de Física (1953) pela demonstração do método de contraste de fase, especialmente pela invenção do microscópio de contraste de fase. Ao desenvolver experiências com redes de difração, descobriu que podia observar a posição de fase de cada raio e pensou em usar o efeito em microscopia.
Sua invenção permitiu a observação de células vivas sem a necessidade do distorcivo emprego de coloração química.

Se você quiser saber mais sobre este cientista, acesse o site http://
ads.brasilesco
la.com/biografia/fri
ts-zernike.htm

Feixe polarizado: A luz natural vibra de maneira aleatória em todas as direções durante sua propagação. A luz polarizada vibra em uma determinada direção.

Birrefringentes ou anisotrópicas: Refratam a luz em dois ângulos diferentes.

Isotrópico: 1. Que tem propriedades físicas independentes da direção (diz-se de um meio); isótropo;
2. Diz-se de um corpo cujas propriedades físicas são constantes, independentemente da direção cristalográfica considerada.

Placa de Petri: É um recipiente cilíndrico, achatado, de vidro ou plástico, que os biólogos utilizam para a cultura de micróbios. O nome foi dado a este instrumento de laboratório em honra ao bacteriologista alemão J.R. Petri (1852-1921), que a inventou em 1877, quando trabalhava como assistente de Robert Koch. É constituído por duas partes: uma base e uma tampa.